

MARINA REUS TASSI DE ARAUJO

**ISOLAMENTO DE *ENTAMOEBAS HISTOLYTICA/E.DISPAR* A
PARTIR DE PLANTIO DE CISTOS EM MEIO DE CULTURA.**

**Monografia apresentada ao
curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do
Paraná, como requisito para a
obtenção do título de Bacharel
de Ciências Biológicas**

**Orientador : Profa. Adriana
Oliveira Costa**

CURITIBA

2005

Trabalho realizado no Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Parte dos experimentos foram realizados no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

À Professora Adriana Oliveira Costa por sua orientação, cobranças, paciência e principalmente pelo seu incentivo;

Ao Departamento de Patologia Básica pela oportunidade de aprendizado;

Ao Professor Edward Felix Silva por disponibilizar o Laboratório de Amebíase (UFMG);

Aos meus pais, Marcello e Eliane pelo apoio desde o início, compreensão e carinho;

Ao Marcio pelos conselhos, paciência, estímulo e principalmente por compartilhar momentos alegres e tristes;

Aos colegas de curso, Marco, Gustavo e Raphael pela convivência agradável durante os quatro anos juntos;

Às amigas Zilda, Eliana, Ana, Camila, Thais e Claudia por darem sentido à palavra amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	v
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.2. Sistemática e Morfologia do Parasito	2
1.3. Ciclo Biológico	4
1.4. Prevalência e importância	5
1.5. A doença	5
1.6. O Cultivo	6
2. OBJETIVOS	7
2.1. Geral	7
2.2. Específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Isolamento	8
3.2. Efetividade dos tratamentos	9
3.3. Positividade das culturas	9
3.4. Cultivo em massa	9
3.5. Perfil isoenzimático	9
4. RESULTADOS	10
4.1. Efetividade dos tratamentos	10
4.2. Positividade das culturas	10
4.3. Estabilização das culturas	13
4.4. Perfil isoenzimático	13
5. DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÕES	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1:	Cisto de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> corado com lugol (X2000). É possível identificar três núcleos	2
Figura 2:	Desenhos de trofozoítos, pré cistos e cistos de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> , <i>Entamoeba coli</i> , <i>Entamoeba hartmanni</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba bütschlii</i> . Adaptado de TANYUSKEL; PETRI (2003)	3
Figura 3:	Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> .ME (X10.000)	3
Figura 4:	Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> . Fonte: HAQUE et al. (2003)	4
Figura 5:	Eletroforese em membrana de acetato celulose mostrando o perfil das isoenzimas ME (enzima málica), HK (hexoquinase), GPI (glicose fosfato isomerase) e PGM (fosfoglicomutase) de isolados de <i>Entamoeba</i> . 1- Controle bactérias, 2-Enta 05, 3-Enta 13, 4-Enta 18, 5-Enta 19, 6- Controle <i>E. histolytica</i> cepa HM-1:IMSS	14
Figura 6:	Eletroforese da enzima HK em membrana de acetato-celulose 1- Controle bactérias, 2-Enta 05, 3-Enta 13, 4-Enta 18, 5-Enta 19, 6- Controle <i>E. histolytica</i> cepa HM-1:IMSS	14
Tabela 1:	Efetividade do tratamento dos sedimentos fecais por diferentes esquemas antes do plantio em meio Pavlova modificado (SILVA, 1972) para isolamento de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	11
Tabela 2:	Positividade das culturas de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> (desencistamento detectado) após tratamento dos sedimentos fecais por diferentes esquemas	12
Tabela 3:	Condição das culturas positivas de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> após plantio em meio Pavlova modificado por SILVA (1972)	13

RESUMO

Entamoeba histolytica é um protozoário que causa a infecção conhecida como amebíase. No entanto, em 1997, foi admitida a existência da *E. dispar*, espécie morfologicamente semelhante à *E. histolytica*, mas ao contrário desta, incapaz de invadir o tecido. Os estudos biológicos, bioquímicos e moleculares que culminaram na aceitação da dualidade das espécies só foram possíveis graças ao cultivo *in vitro* destes protozoários. O objetivo deste trabalho foi comparar alguns esquemas de tratamento dos cistos em sedimento de fezes, para isolamento de *E. histolytica/E. dispar* em cultivo polixênico e identificar os isolados obtidos através de análise isoenzimática. Amostras de sedimentos de fezes positivas para cistos de *E. histolytica/E. dispar* foram processadas por lavagens sucessivas em água e tratadas com os seguintes esquemas: 1º) HCl 1,5%, a 4°C, por 20 horas, 2º) HCl 1,5%, a 4°C, por 20 horas e após, permanganato de potássio 0,02% e 3º) HCl 1,5%, a 4°C, por 20 horas e após, mistura de antimicrobianos, contendo estreptomicina (10 mg/mL), miconazol (0.05 mg/mL) e nistatina (62,5 U/mL). Em algumas amostras foi avaliada a quantidade dos cistos, por contagem em câmara de Neubauer. O material tratado foi plantado em meio Pavlova modificado, contendo parte da microbiota das fezes, previamente isoladas em meio Teague. Foram avaliadas a efetividade dos tratamentos (capacidade de eliminar organismos contaminantes como fungos e *Blastocystis hominis*) e a positividade dos isolamentos (desencistamento detectado). Algumas culturas positivas foram crescidas em garrafas obtendo-se o extrato isoenzimático para pesquisa das enzimas málica (ME), fosfoglicomutase (PGM), glicose-fosfato isomerase (GPI) e hexokinase (HK), por eletroforese em membrana de acetato celulose. Dentre os esquemas de tratamento dos cistos, o menos eficiente para eliminar contaminantes foi o primeiro (17,4% das amostras plantadas não apresentaram contaminantes), enquanto o mais eficiente foi o terceiro (100% das amostras plantadas não apresentaram contaminantes). Quanto à positividade, obteve-se valores 44,8%, 80% e 40% para o primeiro, segundo e terceiro tratamento, respectivamente. Nas amostras em que a quantidade de cistos plantada foi avaliada, percebeu-se que apenas inóculos maiores que 1200 cistos apresentaram trofozoítos nas culturas. Das 29 amostras plantadas, 19 desencistaram, porém apenas 8 culturas se estabilizaram. Em quatro destas culturas foi determinado o perfil isoenzimático, obtendo-se zimodema I, característico de *E. dispar*. Concluiu-se que a positividade das culturas parece depender da quantidade de cistos no sedimento, enquanto a estabilização está relacionada à ausência de contaminantes pelo tratamento prévio dos cistos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A *Entamoeba histolytica* foi descoberta por LÖSCH, em 1875, quando o pesquisador observou trofozoítos amebóides nas fezes de um indivíduo com disenteria. Após a morte do paciente, a autópsia revelou que o intestino grosso apresentava ulcerações, indicando a patogenicidade destas amebas. Em 1903, SCHAUDINN denominou oficialmente de *Entamoeba histolytica* e a diferenciou de *Entamoeba coli*, uma espécie comensal.

Com base em observações de que o comportamento do parasita era variado no hospedeiro, o qual podia ou não apresentar sintomas, algumas classificações para determinar subtipos de *E. histolytica* foram propostas. Segundo KUENEN e SWELLENGREBEL (1913), o parasito apresentaria duas formas, baseando-se no tamanho do trofozoíto: uma denominada “magna”, que seria invasora de tecido, enquanto a outra, “minuta”, seria comensal. Porém, estas expressões foram gradativamente caindo em desuso. Outra teoria, proposta por BRUMPT (1925), sugeria haver duas espécies envolvidas na amebíase: a *E. dysenteriae* (sinonímia de *E. histolytica*) e a *Entamoeba dispar*, morfológicamente idêntica à primeira, mas que viveria como comensal no intestino. Na época esta teoria não foi aceita por não existirem métodos de diferenciação das espécies.

Na década de 70, foi constatado que os isolados provenientes de indivíduos com sintomas, denominados “patogênicos”, apresentavam propriedades biológicas *in vitro*, como a suscetibilidade de aglutinar-se na presença de concanavalina A (MARTINEZ-PALOMO; GONZALEZ-ROBLES; DE LA TORRE, 1973), alta taxa de eritrofagocitose (TRISSEL et al., 1978) e de lisar células cultivadas *in vitro* (OROZCO; MARTINEZ-PALOMO; LOPEZ-REVILLA, 1978), enquanto os isolados “não patogênicos” não apresentavam estas características.

Porém, foi a análise de isoenzimas descrita por SARGEANT et al. (1978 e 1982), que permitiu diferenciar claramente os isolados de *E. histolytica*. O perfil eletroforético (zimodema) das isoenzimas fosfoglicomutase (PGM), glicose fosfato isomerase (GPI), enzima málica (ME) e a enzima hexoquinase (HK), possibilitava distinguir isolados “patogênicos” e “não patogênicos”. Atualmente são conhecidos aproximadamente vinte e um zimodemas e geralmente, a ausência da banda α e a presença da banda β em PGM, assim como as bandas de corrida rápida em HK são consideradas como marcadores de patogenicidade.

Posteriormente, associando dados clínicos dos isolados, o perfil isoenzimático e estudos moleculares (SARGEANT, 1986; DIAMOND, 1992; DIAMOND; CLARK, 1993), a teoria proposta por BRUMPT (1925), voltou a ser reconhecida e apoiada. Em 1997, a

Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997), admitiu oficialmente a *Entamoeba dispar* como espécie avirulenta, responsável pela amebíase assintomática.

1.2. Sistemática e Morfologia do Parasito

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Segundo o Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de protozoologistas (LEVINE et al., 1980), a *Entamoeba histolytica* pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Sarcodina, superclasse Rhizopoda, classe Lobosia, subclasse Gymnamoebida, ordem Amoebida, família Entamoebidae e gênero *Entamoeba*.

Entamoeba histolytica e *Entamoeba dispar* apresentam duas formas evolutivas, uma de resistência e outra de multiplicação, chamadas de cisto e trofozoíto, respectivamente. Os cistos são esféricos ou ovais, medindo 8 a 20 μm , com uma parede refringente. De acordo com estudos realizados com *E. invadens*, uma ameba de répteis similar à *E. histolytica*



Figura 1: Cisto de *E. histolytica*/*E. dispar* corado com lugol (X2000). É possível identificar três núcleos. Fonte: CDC, 1996

(ARROYO-BEGOVICH; CÁRABEZ-TREJO; RUÍZ-HERRERA, 1980), a parede cística contém quitina em sua composição. Cada cisto contém quatro núcleos pequenos quando maduros, os quais apresentam grânulos de cromatina distribuídos uniformemente na membrana nuclear e um cariossoma puntiforme localizado no centro (Figura 1). O citoplasma do cisto contém vacúolos de glicogênio dispersos e corpos cromatóides. Estes últimos apresentam a forma de bastonete com extremidades arredondadas e são compostos de ácido ribonucleico, desoxiribonucleico e fosfato. No entanto, a quantidade e tamanho dos vacúolos de glicogênio diminuem e os corpos cromatóides tendem a

desaparecer quando o cisto amadurece. As estruturas do cisto, quando coradas com hematoxilina-férrica são facilmente observadas e tomam uma coloração escura. Na coloração por iodo, os núcleos e o cariossoma têm um tom marrom claro.

Os cistos de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* podem ser diagnosticados erroneamente durante o exame de fezes, por serem similares a outros cistos de amebas intestinais. Por exemplo, *Entamoeba hartmanni* e *Endolimax nana*, espécies não patogênicas, podem ser confundidas com *E. histolytica* por também apresentarem quatro núcleos, porém os cistos destas duas espécies são menores em tamanho (ambos medindo entre 6 e 8 μm). A Figura 2 mostra desenhos de cistos e trofozoítos das principais amebas intestinais, diferenciando as características de cada uma.

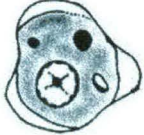


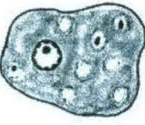


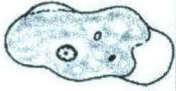


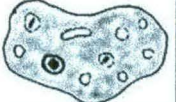

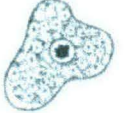

Organism	Trophozoite	Precyst	Cyst
<i>E. histolytica</i> <i>E. dispar</i>			
<i>E. coli</i>			
<i>E. hartmanni</i>			
<i>I. bütschlii</i>			
<i>E. nana</i>			

Figura 2: Desenhos de trofozoítos, pré-cistos e cistos de *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba bütschlii*. Adaptado de TANYUSKEL e PETRI (2003).

Os trofozoítos medem de 10 a 40 µm de diâmetro e são formas pleiomórficas, as quais emitem pseudópodes direcionais quando em temperaturas próximas à 37°C (MARTINEZ – PALOMO, 1988) (Figura 3) . Apresentam polaridade em seu movimento, sendo



Figura 3: Trofozoítos de *E. histolytica*/ *E. dispar*. ME (X10.000). Fonte: D. MIRELMAN, 1996

que contrário à extensão do pseudópode está uma região denominada uróide que acumula componentes como restos celulares e bactérias (MARTINEZ-PALOMO, 1982). Geralmente apresentam somente um núcleo esférico medindo de 4 a 7 µm. O citoplasma apresenta duas zonas, uma externa, chamada de ectoplasma e outra interna, o endoplasma. Enquanto o ectoplasma é transparente e refringente, o endoplasma contém muitas vesículas. O citoplasma é repleto de vacúolos, enquanto as organelas encontradas em células eucarióticas, como o Complexo de Golgi, retículo endoplasmático, centríolos e microtúbulos, parecem estar ausentes neste protozoário (MARTINEZ–PALOMO, 1988). Entretanto, descobriu recentemente uma organela semelhante à mitocôndria, chamada de mitossomo (TOVAR; FISCHER; CLARK, 1999), além de estruturas similares ao retículo endoplasmático e Complexo de Golgi (MAZZUCO; BENCHIMOL; DE SOUZA, 1997).

1.3. Ciclo Biológico

A infecção pela *E. histolytica* ocorre por ingestão de alimentos e água contaminados com os cistos provenientes das fezes de indivíduos infectados. Os cistos podem resistir no ambiente externo por dias ou meses, especialmente quando em locais úmidos (MARKELL;

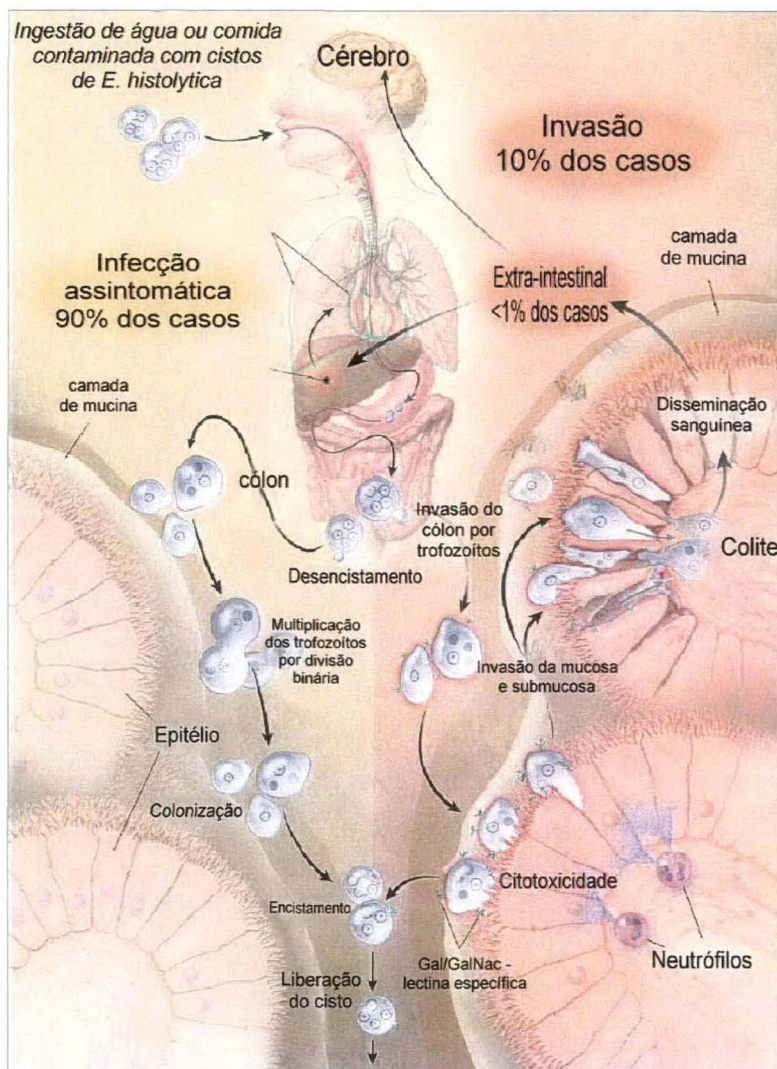


Figura 4: Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*.
Fonte: Adaptado de HAQUE et al. (2003).

JOHN; KROTOSKI, 1999). Quando os cistos são ingeridos, eles resistem ao baixo pH do estômago e chegam ilesos ao final do íleo, no intestino delgado, onde é liberada uma ameba tetranucleada, o metacisto. Este processo ocorre provavelmente por estimulação das baixas tensões de oxigênio, sais inorgânicos e condições osmóticas apropriadas do ambiente intestinal (RAVDIN, 1988). O metacisto se divide em quatro trofozoítos, e estes, por divisões binárias, se multiplicam colonizando o intestino grosso. Na maioria dos casos, os trofozoítos agregam-se na camada de mucina, permanecendo na luz intestinal. Neste local, formam

novos cistos que são liberados junto com as fezes. O encistamento parece ocorrer quando a formação de fezes sólidas é favorável (McCONNACHIE, 1969) e o processo se dá pela transformação de trofozoítos localizados no lúmen do intestino em pré-cisto (somente um núcleo) e em seguida no cisto propriamente dito.

Em alguns casos, porém, os trofozoítos podem invadir a mucosa intestinal e provocar lesões. A partir deste ponto, a invasão do peritônio, fígado e outros órgãos se tornam viáveis, no entanto são raras. O processo de invasão se inicia quando ocorre aderência mediada por uma lectina do parasita que se liga à galactose e N-acetil-D-galactosamina do

hospedeiro, levando a lise e destruição de células epiteliais e outras células (PETRI; HAQUE; MANN, 2002). A formação de cistos não ocorre no interior dos tecidos, somente na luz intestinal.

1.4. Prevalência e importância

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), a amebíase é a quarta causa mais importante de morte por protozoário, depois da malária, Doença de Chagas e leishmaniose. Estima-se que 10% da população mundial esteja infectada por *Entamoeba histolytica* (WALSH, 1986), porém, sabe-se que provavelmente que 90% destas infecções sejam por *Entamoeba dispar* (GATHIRAM; JACKSON, 1985).

A amebíase ocorre no mundo todo, com maior prevalência em regiões onde o saneamento básico e higiene são precários, sendo o México um dos países mais atingidos (SEPÚLVEDA, 1976). No Brasil, segundo CUNHA; CASTRO e ROCHA (1991), a prevalência de *E. histolytica*/ *E. dispar* varia entre as diferentes regiões, assim como a patogenicidade. As estimativas de infecções por *E. histolytica*/ *E. dispar* é de 2,5 a 11% no Sul e Sudeste, 10% no Nordeste e Centro-Oeste e 19% no Norte (SILVA; GOMES, 2001).

Atualmente, kits de diagnóstico por técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e coproantígenos pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) têm sido utilizados para determinar a prevalência de *E. histolytica* e/ou *E. dispar* em algumas regiões do Brasil. PINHEIRO et al. (2004) analisaram 1437 amostras de fezes da região Nordeste por técnica de PCR, encontrando 59 (4%) positivas para *E. dispar*. Outro estudo também realizado na região Nordeste (cidade de Fortaleza), utilizando Kit para análise de coproantígenos por técnica de ELISA, detectou 20% de *E. histolytica*/ *E. dispar* em amostras fecais. Quando estes utilizaram um kit específico para *E. histolytica*, 10,6% amostras foram positivas (BRAGA et al., 1998). A disponibilidade destas técnicas deverão permitir estudos mais freqüentes e atualizados sobre a prevalência da amebíase em outras regiões do Brasil.

1.5. A doença

Entamoeba histolytica e *E. dispar* habitam o intestino grosso do ser humano. Entretanto, somente a primeira é capaz de aderir e lisar células epiteliais, invadindo o tecido do hospedeiro. Assim, surgem quadros clínicos: colites não disentericas, colites disentericas, amebomas, apendicite por ameba e amebíase extra-intestinal. Esta classificação de formas clínicas, que ainda inclui a forma assintomática, foi proposta pelo Comitê de Peritos da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1969) e adotada por CUNHA (1975) no Brasil. A colite não disenterica é caracterizada por episódios de evacuações

diarréicas ou não alternados pelo funcionamento normal do intestino e até constipação. As colites disintéricas são caracterizadas por diarreias sanguinolentas, dores abdominais e perda de peso, decorrentes das úlceras e necroses formadas pela invasão da ameba. Podem evoluir para amebomas, que são massas granulomatosas, ou apendicite. Casos agudos de colites disintéricas levam ao desenvolvimento de diversas úlceras e necrose do cólon. Na amebíase extra-intestinal, a *E. histolytica* pode invadir outros órgãos, como fígado, pulmão e cérebro, sendo o fígado o mais atingido. Quanto à infecção assintomática, sabe-se que pode ser causada tanto pela *E. histolytica* como pela *E. dispar*, porém supõe-se que a maioria dos indivíduos assintomáticos esteja infectada por *E. dispar* (CLARK, 1998; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTINEZ-PALOMO, 2000).

Em outros países, pesquisadores como TANYUSKEL e PETRI (2003), utilizam outra classificação clínica, na qual a infecção é separada entre colonização assintomática, colite por ameba e disenteria e, por último, amebíase extra-intestinal.

1.6. O Cultivo

Os estudos que culminaram no entendimento atual da amebíase só foram realizados graças às técnicas de isolamento e cultivo *in vitro* de *Entamoeba sp.* Um dos desafios foi desenvolver meios de cultivo para um crescimento favorável dos trofozoítos. O cultivo destes protozoários pode ser realizado no sistema polixênico (no qual o parasito é cultivado junto com parte da microbiota intestinal), monoxênico (cultivo em presença de uma outra espécie somente) e o axênico (cultivo na ausência de qualquer outra espécie).

O primeiro cultivo de *Entamoeba histolytica* foi o polixênico, preparado por BOECK E DRBOHLAV em 1925, em meio difásico. Atualmente os meios para cultivo polixênico mais utilizados são o LE e de Robinson (ROBINSON, 1968), ambos difásicos, e o TYSGM-9 (monofásico), elaborado por DIAMOND (1982). O meio Pavlova (PAVLOVA, 1938) é bastante simplificado, tendo sido modificado por SILVA (1972). Este meio, composto de extrato de levedo em solução salina tamponada, amido de arroz e soro bovino, é seletivo para *E. histolytica* e *E. dispar*. Os componentes permitem o desenvolvimento dos trofozoítos e um controle sobre a microbiota. O amido de arroz serve como fonte de energia (carboidrato) enquanto o soro bovino e a fagocitose de bactérias satisfazem a necessidade de outros nutrientes para o crescimento da ameba.

O sistema monoxênico, usualmente uma fase de transição para o axênico, pode utilizar como organismos associados algumas bactérias ou tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata* (PHILLIPS, 1951). Este último é o mais empregado pela facilidade de cultivar e por não ser infectante para o ser humano (DIAMOND, 1968a).

Para o cultivo axênico, meios complexos foram desenvolvidos para permitir o crescimento de *Entamoeba sp.* Os compostos são aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e vitaminas. Desde a primeira axenização de *E. histolytica/E. dispar* (DIAMOND, 1961), outros meios foram elaborados, como o TP-S-1 (DIAMOND, 1968b), TYI-S-33 (DIAMOND; HARLOW; CUNNICK, 1978) e por último, o YI-S (DIAMOND; CLARK; CUNNICK, 1995). A axenização permitiu estudar características da ameba sem que houvesse a influência de bactérias. Tanto *E. histolytica* e *E. dispar* crescem em cultivos polixênicos, mas poucos pesquisadores conseguiram manter *E. dispar* em meio axênico (CLARK, 1995; KOBAYASHI et al., 1998). Esta diferença indica que provavelmente a *E. dispar* parece não ser tão capaz quanto a *E. histolytica* de captar nutrientes do meio de cultivo.

A grande maioria dos isolamentos de *E. histolytica/ E. dispar* é realizada a partir de cistos das fezes. Deste modo, um outro desafio no cultivo destes protozoários é eliminar organismos contaminantes que estão no material fecal. Além de bactérias, leveduras e outros, uma das contaminações mais comuns e difíceis de combater é a por *Blastocystis hominis*. Este parasito, pertencente ao reino Chromista, passa muitas vezes despercebido no exame de fezes e quando em cultivo polixênico cresce demasiadamente, interferindo e prejudicando o desenvolvimento de trofozoítos de *Entamoeba sp.*

Para a eliminação destes contaminantes o sedimento fecal pode ser tratado com diversas substâncias. Em 1926, DOBELL e LAIDLAW sugeriram tratamentos com acriflavina e ácido clorídrico 0,1 N. SILVA (1997) e SILVA; GOMES e MARTINEZ (1997) utilizaram, além do HCl 1,5 a 2%, tratamento seqüencial com permanganato de potássio 0,02%, acriflavina 0,002% e bicloreto de mercúrio 0,02%, viabilizando culturas em sistema monoxênico e axênico a partir de cistos de fezes.

Neste trabalho, procuramos avaliar alguns esquemas de tratamento de sedimento fecal buscando otimizar o isolamento de *E. histolytica/ E. dispar* a partir de cistos das fezes, permitindo assim o cultivo e caracterização isoenzimática de isolados obtidos no Estado do Paraná. Utilizamos o sistema de cultivo polixênico, devido à sua maior simplicidade e capacidade de manter o crescimento tanto de *E. histolytica* quanto de *E. dispar*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Comparar esquemas de tratamento do sedimento fecal para isolamento de *E. histolytica/ E. dispar* em cultivo polixênico, a partir de cistos de fezes de humanos.

2.2. Específicos

2.2.1 Avaliar a efetividade de esquemas de tratamento prévio de sedimentos fecais com soluções de HCl, permanganato de potássio e mistura antimicrobiana, para prevenção de contaminações por fungos, leveduras ou *Blastocystis hominis* no isolamento de *E. histolytica* / *E. dispar* ;

2.2.2 Verificar a presença de trofozoítos em meio de cultivo após o plantio de sedimentos fecais contendo cistos de *E. histolytica*/ *E. dispar*, submetidos aos tratamentos acima;

2.2.3 Determinar o perfil isoenzimático do (s) isolado (s) de *E. histolytica*/ *E. dispar* obtido (s) em cultivo polixênico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento

Vinte e nove sedimentos de fezes positivas para cistos de *E. histolytica*/*E. dispar* foram cedidos pelo Laboratório Municipal de Curitiba ou obtidos de exames parasitológicos de fezes realizados no departamento de Patologia Básica, SCB, UFPR. Inicialmente, uma porção de cada sedimento foi semeada em meio Teague, o qual seleciona enterobactérias, e incubado em estufa a 36°C por um dia, para isolamento de parte da microbiota bacteriana das fezes. O restante do sedimento foi lavado por centrifugação com água estéril três vezes, a 1000 rpm e ressuspendido em volume total de 1 mL. Em parte das amostras a quantidade de cistos presente no sedimento foi estimada por contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, os sedimentos foram divididos em partes e submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1) 4 mL de HCl 1,5%, a 4°C, por cerca de 20 h;
- 2) 4 mL de HCl 1,5%, a 4°C, por cerca de 20 h, lavagem por centrifugação a 1500 rpm 5 minutos em água destilada estéril e 2 mL de solução de KMnO₄ 0,02% por 2 horas;
- 3) 4 mL de HCl 1,5%, a 4°C, por cerca de 20 h, lavagem por centrifugação a 1500 rpm 5 minutos em água destilada estéril e uma mistura antimicrobiana e incubado por 20 h. A mistura era composta pelos seguintes antimicrobianos: 20µL de estreptomicina 500mg/mL (concentração final de 10mg/mL), 50µL de miconazol 1 mg/mL (concentração final de 0,05mg/mL) e 25µL de nistatina 2500 U/mL (concentração final de 62,5 U/mL).

Devido à pequena quantidade de material, os sedimentos só puderam ser submetidos a um ou dois tratamentos. Após cada tratamento, o sedimento era novamente lavado por centrifugação em água estéril e plantado 0,5 mL nos tubos de cultura, juntamente

com a microbiota previamente isolada. Com isso, foi possível calcular a quantidade de cistos inoculada em algumas culturas. As culturas foram mantidas em tubos de vidro 150mm X 15mm, com tampa de rosca ou algodão, contendo cerca de 10 mL de meio Pavlova modificado, em posição vertical, a 36° C. Repiques das culturas foram realizados de 48 em 48 ou 72 em 72 horas.

3.2. Efetividade dos tratamentos

A avaliação da efetividade dos esquemas de tratamento na eliminação dos contaminantes foi realizada pela verificação da presença ou ausência de fungos filamentosos, leveduras e *Blastocystis hominis* nos tubos de cultura. O exame foi realizado através da verificação em microscópio óptico, entre lâmina e lamínula, por um período de até 10 dias. Caso não houvesse qualquer tipo de contaminação, era realizado o repique, caso fosse detectado o repique era realizado da mesma maneira, procurando que a cultura se estabilizasse.

3.3. Positividade das culturas

Após o plantio, foi realizado o exame microscópico entre lâmina e lamínula, para constatação da presença ou ausência de trofozoítos nos tubos de cultura por um período de até 10 dias. Essa constatação era realizada diariamente, porém os repiques eram realizados de 48 em 48 horas ou de 72 em 72 horas, mesmo se não houvesse trofozoítos na cultura. Se após dez dias não houvesse ocorrido o desencistamento, a cultura era descartada.

3.4. Cultivo em massa

Após o isolamento, as amostras foram repicadas para garrafas de cultivo Costar®, com área de 25 cm² ou 75 cm², contendo respectivamente 20 mL e 60 mL de meio. As garrafas foram incubadas horizontalmente a 36° C, por 48 a 72 horas. O desenvolvimento foi observado em microscópio invertido. Quando se constatava crescimento adequado de trofozoítos e quantidade mínima ou ausente de grãos de amido, a cultura era processada para extração isoenzimática.

3.5. Perfil isoenzimático

Trofozoítos em fase exponencial de crescimento foram recuperados de garrafas de cultivo, transferidos para tubos de centrifugação de 15 mL e lavados duas vezes com PBS

pH 7,2, por centrifugação a 1000 rpm. Após contagem do número de trofozoítos na câmara de Neubauer o sedimento foi transferido para um microtubo e centrifugado a 14.500 rpm, a 4° C por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento adicionou-se estabilizador enzimático (ditiotreitól 2,0 mM, ácido E-amino capróico 2,0 mM e EDTA 2,0 mM, em pH 7,0) na proporção de 50 µl para cada $2,5 \times 10^4$ trofozoítos. Após lise por congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 36° C, por três vezes, o material foi novamente centrifugado a 14500 rpm, a 4° C, por 15 minutos. Com o sobrenadante foram confeccionadas pérolas de 20 µl, conservadas em N₂ líquido.

A determinação do perfil isoenzimático foi realizada no Laboratório de Amebíase da Universidade Federal de Minas Gerais, em sistema de eletroforese horizontal (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA) em membrana de acetato-celulose (TITAN III, cat n° 3024). Foram pesquisadas as enzimas málica (ME, EC 1.1.1.40), fosfoglicomutase (PGM, EC 2.7.5.1), glicose fosfato isomerase (GPI, EC 5.3.1.9) e hexoquinase (HK, EC 2.7.1.1), reveladas com base nos protocolos de MOSS e MATHEWS (1987), com modificações.

4. RESULTADOS

4.1. Efetividade dos tratamentos

Na análise da efetividade dos tratamentos prévios dos sedimentos fecais com 3 diferentes esquemas (**Tabela 1**) observou-se que o tratamento utilizando somente HCl 1,5% foi o menos efetivo, ou seja, somente 4 das 23 amostras (17,4%) não apresentaram contaminação por fungos, leveduras ou *B. hominis*. O tratamento mais efetivo foi aquele que utilizou solução de HCl seguida de exposição à mistura de antimicrobianos, onde não foi detectada contaminação nos isolados analisados (efetividade de 100%). No tratamento de HCl e permanganato de potássio a efetividade foi de 66,7% (6/9).

4.2. Positividade das culturas

A positividade das culturas, ou seja, se houve ou não o desencistamento, foi detectado pela presença de trofozoítos, após os tratamentos. Das 29 amostras, foram positivas 44,8%, 80% e 40%, para os tratamentos 1, 2 e 3 respectivamente. Nas culturas Enta 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, em que quantidade de cistos nos sedimentos foi estimada, o número de cistos variou entre 40 a 540.000 cistos/mL, ou seja, foram realizados inóculos de 20 a 270.000 cistos (**Tabela 2**).

Tabela 1: Efetividade* dos tratamentos dos sedimentos fecais antes do plantio em meio Pavlova modificado (SILVA, 1972) para isolamento de *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar*.

Amostras	Tratamentos**		
	1	2	3
Enta 1	-	nr	Nr
Enta 2	-	nr	Nr
Enta 3	-	nr	Nr
Enta 4	-	-	nr
Enta 5	-	+	nr
Enta 6	-	nr	nr
Enta 7	-	nr	nr
Enta 8	-	nr	nr
Enta 10	-	+	nr
Enta 11	nr	-	nr
Enta 12	-	-	nr
Enta 13	+	+	nr
Enta 14	-	+	nr
Enta 15	-	+	nr
Enta 16	-	nr	nr
Enta 18	-	nr	nr
Enta 19	-	+	nr
Enta 20	-	nr	+
Enta 22	-	nr	+
Enta 23	-	nr	+
Enta 24	+	nr	+
Enta 25	+	nr	+
Enta 26	-	nr	+
Enta 27	-	nr	+
Enta 28	-	nr	nr
Enta 29	+	nr	+
Total	4/23 (17,4%)	6/9 (66,7%)	8/8 (100%)

* Avaliação de Efetividade:

(+) Tratamento efetivo (sem contaminação)

(-) Tratamento não efetivo (contaminação por fungos, leveduras ou *B. hominis*)

(nr) Não realizado

** Tratamentos antes do plantio:

1) HCl 1,5%, a 4°C, por 20 horas;

2) HCl 1,5%, a 4°C por 20 horas e na sequência, solução de KMnO₄ 0,02% por 2 horas;

3) HCl 1,5%, a 4°C por 20 horas e na sequência, mistura de antimicrobianos (estreptomicina, miconazol, nistatina) a 4°C por 20 horas

Tabela 2: Positividade* das culturas de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* (desencistamento detectado) após tratamento dos sedimentos fecais.

Amostras	Quantidade de cistos ***	Tratamentos**		
		1	2	3
Enta 1	nr	+	nr	nr
Enta 2	nr	-	nr	nr
Enta 3	nr	+	nr	nr
Enta 4	nr	+	+	nr
Enta 5	nr	-	+	nr
Enta 6	nr	-	nr	nr
Enta 7	nr	-	nr	nr
Enta 8	nr	+	nr	nr
Enta 9	nr	-	nr	nr
Enta 10	nr	+	+	nr
Enta 11	nr	+	+	nr
Enta 12	nr	-	+	nr
Enta 13	nr	+	+	nr
Enta 14	nr	-	-	nr
Enta 15	nr	-	-	nr
Enta 16	nr	+	+	nr
Enta 18	nr	-	nr	nr
Enta 19	nr	-	+	nr
Enta 20	660	-	nr	-
Enta 21	nr	-	nr	-
Enta 22	nr	-	nr	-
Enta 23	480	-	nr	-
Enta 24	270.000	+	nr	+
Enta 25	440	-	nr	-
Enta 26	1.720	+	nr	+
Enta 27	5.100	+	nr	+
Enta 28	4.560	+	nr	nr
Enta 29	1.220	+	nr	+
Enta 30	20	-	nr	-
Total		13/29 (44,8%)	8/10 (80%)	4/10 (40%)

* Avaliação da positividade:

(+) Presença de trofozoitos na cultura

(-) Ausência de trofozoitos na cultura

(nr) Não realizado

** Tratamentos antes do plantio:

1) HCl 1,5%, a 4°C, por 20 horas

2) HCl 1,5%, a 4°C, por 20 horas e na sequência, solução de KMnO₄ 0,02% por 2 horas;

3) HCl 1,5%, a 4°C, por 20 horas, e na sequência, mistura de antimicrobianos (estreptomicina, miconazol, nistatina) a 4° C por 20 horas

*** Quantidade de cistos inoculados nas culturas

4.3. Estabilização das culturas

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Das 29 tentativas de isolamento, houve desencistamento de 19 amostras, porém somente oito estão sendo mantidas até o presente momento. O fator principal pelo qual 11 das amostras não se estabilizaram foi a contaminação (**Tabela 3**).

Tabela 3: Condição das culturas positivas de *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar* após plantio em meio Pavlova modificado por SILVA (1972).

Cultura	Manutenção	Perda
Enta 1	Não	Desconhecida
Enta 3	Não	Contaminação
Enta 4	Não	Contaminação
Enta 5	Sim	--
Enta 7	Não	Contaminação
Enta 8	Não	Contaminação
Enta 9	Não	Desconhecida
Enta 10	Não	Desconhecida
Enta 11	Não	Contaminação
Enta 12	Não	Contaminação
Enta 13	Sim	--
Enta 16	Não	Acidental
Enta 18	Sim	--
Enta 19	Sim	--
Enta 24	Sim	--
Enta 26	Sim	--
Enta 27	Sim	--
Enta 28	Não	Contaminação
Enta 29	Sim	--

4.4. Perfil Isoenzimático

Foram realizadas as eletroforeses em membrana de acetato-celulose das enzimas ME (málica), HK (hexoquinase), GPI (glicose fosfato isomerase) e PGM (fosfoglicomutase) de quatro isolados obtidos (Enta 5, enta 13, Enta 18 e Enta 19). Todos os isolados testados apresentaram o zimodema I, característico de *E. dispar*, que apresenta bandas de corrida lenta em HK e a presença da banda α e ausência da banda β em PGM (Figuras 5 e 6). Todas as corridas foram realizadas com controle de bactérias e cepa referência *E. histolytica* HM-1.

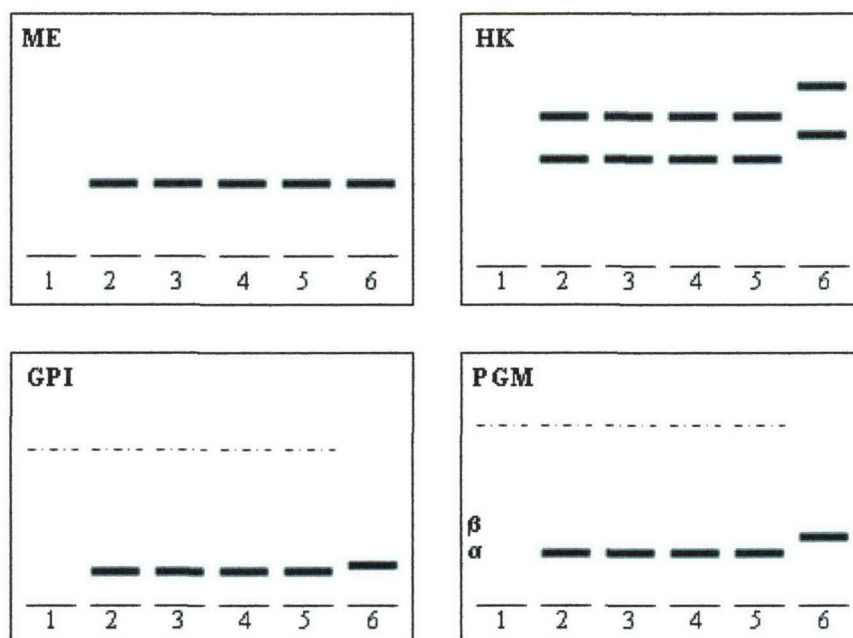


Figura 5: Eletroforese em membrana de acetato celulose mostrando o perfil das isoenzimas ME (enzima málica), HK (hexoquinase), GPI (glicose fosfato isomerase) e PGM (fosfoglicomutase) de isolados de *Entamoeba*. 1-Controle bactérias, 2-Enta 05, 3-Enta 13, 4-Enta 18, 5-Enta 19, 6- Controle *E. histolytica* cepa HM-1: IMSS.

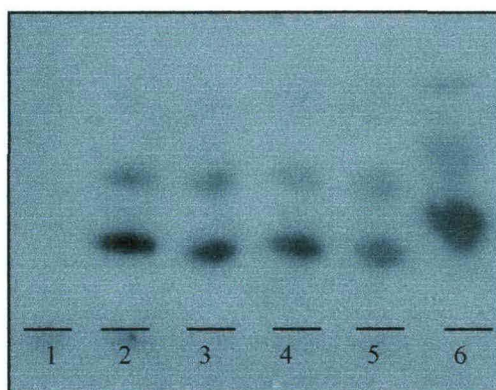


Figura 6: Eletroforese da enzima HK em membrana de acetato-celulose 1-Controle bactérias, 2-Enta 05, 3-Enta 13, 4-Enta 18, 5-Enta 19, 6- Controle *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS

5. DISCUSSÃO

O isolamento de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*, assim como de outros protozoários, é bastante trabalhoso, porém a disponibilidade de culturas *in vitro* do parasito viabiliza estudos onde uma grande quantidade de células é necessária (CLARK; DIAMOND, 1992). Um dos fatores limitantes para o isolamento bem sucedido de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* é a presença de contaminantes, especialmente o *Blastocystis hominis* e fungos. Em nosso trabalho, algumas tentativas preliminares de tratar trofozoítos já desencistados nas culturas (dados não mostrados) indicaram que as substâncias como a nistatina e o miconazol, utilizadas para eliminar fungos e *Blastocystis*, muitas vezes afetavam a microbiota ou os próprios trofozoítos, prejudicando o desenvolvimento da cultura. Por este motivo, procuramos avaliar tratamentos do sedimento com cistos, que são mais resistentes, utilizando como base protocolos já descritos (SILVA, 1997). Estes protocolos foram utilizados nas primeiras tentativas de isolamento, onde foi observada maior ocorrência de contaminação nas culturas. Assim, um tratamento alternativo foi proposto: exposição ao HCl 1,5% e posteriormente, à mistura de antimicrobianos. A efetividade deste esquema de tratamento foi ótima, pois nenhum contaminante foi detectado nas amostras testadas. Por outro lado, a positividade não foi elevada (40%). Entretanto, observando-se a tabela 2, nota-se que várias amostras em que a cultura não foi positiva neste tratamento também apresentavam quantidade de cistos muito baixa. Este mesmo padrão também foi observado para o esquema de tratamento 1 (HCl 1,5%), onde somente os inóculos maiores que 1200 cistos resultaram em culturas positivas. Assim, embora inicialmente procurássemos relacionar a positividade das culturas com os tratamentos efetuados, os quais poderiam prejudicar sua sobrevivência e conseqüentemente o desencistamento, nossos resultados sugeriram que a positividade está associada à quantidade de cistos do sedimento. Infelizmente não foi realizada a quantificação dos cistos em todas as amostras. Com as primeiras amostras, uma avaliação empírica foi realizada, tomando-se nota se o sedimento estava rico ou pobre de cistos. Entretanto, este procedimento não permitiria um resultado conclusivo, motivo pelo qual iniciamos a quantificação dos cistos nas últimas amostras.

Somente o tratamento com HCl 1,5% não foi eficiente para conter qualquer tipo de contaminação, ou seja, a utilização deste esquema teve efetividade baixa nas amostras que utilizamos.

As contaminações foram confirmadas como principal fator para perda das culturas em que houve o desencistamento. É provável que outras variáveis, como a capacidade de adaptação da cepa ao cultivo *in vitro* e crescimento adequado da microbiota possam também influenciar na estabilização das culturas. CLARK e DIAMOND (2002) sugerem a

utilização de baixas concentrações de antimicrobianos como penicilina e estreptomicina no meio de cultivo para o controle da microbiota associada. Entretanto, em nossas amostras não foi necessário, pois a microbiota apresentou um crescimento satisfatório.

A análise isoenzimática foi realizada em quatro amostras, todas apresentaram zimodema I, típico de *E. dispar*. Apesar de ser uma pequena amostra estudada, o resultado segue a tendência de predominância de *E. dispar*, conforme sugere alguns trabalhos realizados (CLARK, 1998; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTINEZ-PALOMO, 2000).

Segundo CLARK e DIAMOND (2002), a estabilização e o crescimento de *E. histolytica* / *E. dispar* é mais uma arte do que ciência propriamente dita, pois alguns fatores para estabilização das culturas não podem ser previstos ou evitados. Apesar disso, este trabalho procurou buscar alternativas que resultassem em índices melhores de isolamento mais bem sucedido, aumentando o rendimento. Destaca-se que não foi possível realizar todos os tratamentos com todas as amostras, devido à pequena quantidade de material disponível. Portanto, foi necessário escolher dois dos três esquemas para realizar o plantio. Apesar desta limitação, os resultados permitiram inferir que o melhor tratamento para o sedimento de fezes, antes do plantio, foi por HCl 1,5% seguida de mistura antimicrobiana (estreptomicina 500mg/mL, nistatina 2500 U/mL e miconazol 1mg/mL).

6. CONCLUSÕES

- No isolamento de *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar*, o tratamento prévio do sedimento fecal com HCl 1,5% mais a mistura antimicrobiana (estreptomicina 500mg/mL, nistatina 2500 U/mL e miconazol 1mg/mL) se mostrou mais eficiente para eliminar contaminantes, contribuindo para a estabilização das culturas;
- A positividade das culturas de *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar* (desencistamento em meio Pavlova modificado) parece depender da quantidade de cistos. Inóculos maiores que 1000 cistos favorecem o desencistamento;
- Oito isolados se estabilizaram no cultivo polixênico. O perfil isoenzimático de quatro isolados foi determinado, obtendo-se zimodema I, típico de *E. dispar*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARROYO-BEGOVICH, A.; CÁRABEZ-TREJO, A.; RUÍZ-HERRERA, J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. **J. Parasitol.**, v. 66, p. 735-741, 1980.
- BOECK, W. C.; DROBOHLAV, J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. **Am. J. Hyg.**, v. 5, p. 371-407, 1925.
- BRAGA, L.L.; MENDONÇA, Y.; PAIVA, C.A.; SALES, A.; CAVALCANTE, A.L.; MANN, B.J. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. **J. Clin. Microbiol.** Oct; v. 36(10), p. 3044-5, 1998.
- BRUMPT, E. Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n.sp. amibe akkystes quadrinuclees, parasite de l'homme. **Bull. Acad. Med.** (Paris), v. 94, p. 942-952, 1925.
- CLARK C.G., *Entamoeba dispar*: an organism reborn. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, p. 361-364, 1998.
- CLARK C.G. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. **J. Euk. Microbiol.**, v. 42, p. 590-593, 1995.
- CLARK C.G.; DIAMOND L.S. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. **Clin. Microbiol. Rev.** Jul; v. 15(3), p. 329-41, 2002.
- CUNHA, A. **Patogenia da Amebíase**, Belo Horizonte, 1975. 160p. Tese de Concurso para Professor Titular. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFMG.
- CUNHA, A.S.; CASTRO, L.; ROCHA, P. Amebíase In: ROCHA P.R.S.; CUNHA A.S.; organizadores. **Tópicos em gastroenterologia 2: gastroenterologia tropical**. Rio de Janeiro: Editora Medsi, p. 287-316, 1991.
- DIAMOND, L.S. Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica*. **Science**, v. 134, p. 336-337, 1961.
- DIAMOND, L.S. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. histolytica* -like amebae. **J. Parasitol.**, v. 54, p. 1047-1056, 1968b.
- DIAMOND, L.S. Improved method for the monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica* - like amebae with trypanosomatids. **J. Parasitol.**, v. 54, p. 715-719, 1968a.
- DIAMOND, L.S. Amebiasis: A problem Solved: What now? **Arch. Med. Res.**, v. 23, p. 157-161, 1992.
- DIAMOND, L.S. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. **J. Parasitol.**, v. 68, p. 958-959, 1982.
- DIAMOND, L.S.; CLARK, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 (Emended Walker, 1911) Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **J. Euk. Microbiol.**, v. 40, p. 340-344, 1993.
- DIAMOND, L.S.; HARLOW, D.R.; CUNNICK, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 431-432, 1978.
- DIAMOND, L.S.; CLARK, C.G.; CUNNICK, C.C. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. **J. Euk. Microbiol.**, v. 42, p. 277-278, 1995.
- DOBBELL, C.; LAIDLAW, P.P. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other Entozoic amoebae. **Parasitology**, v. 18, p. 283-317, 1926.
- ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTINEZ-PALOMO. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 13, p. 18-331, 2000.

- GATHIRAM, V.; JACKSON, T.F.H.G. Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. **Lancet I**, p. 719-721, 1985.
- HAQUE, R.; HUSTON, C.D.; HUGHES, M.; HOUP, E.; PETRI, W.A. JR. Amebiasis. **N. Engl. J. Med.** Apr 17, 348(16), p. 1565-73, 2003.
- KOBAYASHI, S.; IMAI, E.; TACHIBANA, H.; FUJIWARA, T.; TAKEUCHI, T. *Entamoeba dispar*: cultivation with sterilized *Crithidia fasciculata*. **J. Euk. Microbiol.**, v. 45, p. 3S-8S, 1998.
- KUENEN, W. A.; SWELLENGREBEL, N. H. Die Entamoeben des Menschen und ihre praktische Bedeutung. **Zentbl. Bakt. Parasitkde.**, v. 71, p. 378-410, 1913.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R. 3RD; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. **J. Protozool.**, v. 27, p. 37-58, 1980.
- LÖSCH, F. Massenhafte Entwicklung von Amöben im Dickdarm. **Virchows. Archiv. Klinische Medizin.**, v. 65, p. 196-211, 1875.
- MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; KROTOSKI, W.A. **Lumen-dwelling protozoa**, 8th ed. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa, 1999.
- MARTINEZ-PALOMO, A. **Biology of Amebiasis: Progress and Perspectives in The Biology of Parasitism**. Ed. P.T. England & A. Sher, p. 61-76, 1988.
- MARTINEZ-PALOMO, A.; GONZALEZ-ROBLES, A.; DE LA TORRE, M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by Con-A. **Nature New Biol.**, v. 245, p. 186-187, 1973.
- MARTINEZ-PALOMO, A. Parasite factors of virulence. In: **The biology of Entamoeba histolytica**. Baffins Lane, John Wiley & Sons. Research Studies Press, England, UK: 95-117, 1982.
- MAZZUCO, A.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. **Micron.**, v. 28, p. 241-7, 1997.
- McCONNACHIE, E.W. The morphology, formation and development of cysts of *Entamoeba*. **Parasitology**, v. 59, p. 41-53, 1969.
- MOSS, D.M.; MATHEWS, H.M. A fast electrophoretic isoenzyme technique for the identification of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* and "*E. histolytica*-like" organism. **J. Protozool.**, v. 34, p. 253-255, 1987.
- OROZCO, E.; MARTINEZ -PALOMO, A.; LOPEZ-REVILLA, R. Um modelo *in vitro* para el estudio cuantitativo de la virulencia de *Entamoeba histolytica*. **Arch. Invest. Med.**, v. 9 (Supp. 1), p. 257-260, 1978.
- PAVLOVA, E.A. Culture methods for *Entamoeba histolytica*. **Medskaia Parazit.**, v. 27, p. 224-227, 1938.
- PETRI, W.A. JR.; HAQUE, R.; MANN, B.J. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 39-64, 2002.
- PHILLIPS, B.P. Comparative effects of certain species of Tripanosomatidae on the growth of *Entamoeba histolytica* in the absence of bacteria. **Am. J. Trop. Med.**, v. 31, p. 290, 1951.
- PINHEIRO, S.M.; CARNEIRO, R.M.; ACA, I.S.; IRMAO, J.I.; MORAIS, M.A. JR.; COIMBRA, M.R.; CARVALHO, L.B. JR. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco state of northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Feb; v. 70(2), p. 221-4, 2004.
- RAVDIN, J.I. **Amebiasis Human Infection by Entamoeba histolytica**. Ed John Wiley & Sons., p 126-149, 1988.
- ROBINSON, G.L. The Laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 285-294, 1968.

SARGEANT, P.G. "*Entamoeba histolytica*" is a complex of two species [letter]. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 167-172, 1986.

SARGEANT, P.G.; WILLIAMS, J.E.; BHOJNANI, R.; KUMATE, J. & JIMENEZ, E. A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. **Arch. Invest. Med. (Mex)**, v. 13 (suppl 3), p. 89-94, 1982.

SARGEANT, P.G.; WILLIAMS, J.E.; GREENE, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 72, p. 519-521, 1978.

SCHAUDINN, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. **Arch. a. d. Kaiserl. Ges. d. Med.**, v. 19, p. 547-576, 1903.

SEPÚLVEDA, B. Immunology of amebiasis. In **Proceedings of the International Conference on Amebiasis**. Ed B. Sepúlveda and L.S. Diamond. IMSS Mexico City, p. 686-702, 1976.

SILVA, E.F. *Entamoeba histolytica*: Isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade "*in vivo*" e "*in vitro*" – Tese de Doutorado- Departamento de Parasitologia, ICB/UFGM, Belo Horizonte, 285p., 1997.

SILVA, E.F. *Entamoeba moshkovskii* TSHALIA, 1941: Novos focos na América do Sul; aspectos da morfologia e biologia em comparação com a *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903 e *Entamoeba ranarum* GRASSI, 1879, Belo Horizonte, 1972. 141p. Departamento de Parasitologia.

SILVA, E.F.; GOMES, M.A. & MARTINEZ, A.M.B. *Entamoeba histolytica*: Axenization and characterization of isolated samples from symptomatic and asymptomatic patients from different regions of Brazil. **Arch. Med. Res.**, v. 28, p. S288-S289, 1997.

SILVA, E.F.; GOMES, M.A. Amebíase: *Entamoeba histolytica*/ *Entamoeba dispar*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. (Eds.), *Parasitologia Humana*, tenth ed, Ed. Atheneu, São Paulo, p. 114—124, 2001.

TANYUSKEL, M.; PETRI W.A. JR. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clin. Microbiol. Rev.** Oct; v. 16(4), p. 713-29, 2003.

TOVAR, J.; FISCHER, A.; CLARK, C.G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite, *Entamoeba histolytica*. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 1013-1021, 1999.

TRISSEL, D.; MARTINEZ-PALOMO, A.; DE LA TORRE, M.; DE LA HOZ, R.; PEREZ-SUAREZ, E. Surface properties of *Entamoeba histolytica*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. **J. Exp. Med.**, v. 19, p. 1137-1145, 1978.

WALSH, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Rev. Infect. Dis.**, v. 8, p. 228-238, 1986

WHO/PAHO/ UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis Mexico city, Mexico, 1997

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health report 1998 Life in the 21st Century: a vision for all**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998

WORLD HEALTH ORGANIZATION- **Expert Committee Amebiasis technical report series**, nº 421, 1969.